

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Caracterização Molecular de Isolados de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes às  
Polimixinas

LISIANE RECH PANCOTTO

PORTO ALEGRE, 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Caracterização Molecular de Isolados de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes às  
Polimixinas

Dissertação apresentada por **Lisiane  
Rech Pancotto** para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Coorientadora: Prof. Dra. Juliana Caierão

PORTO ALEGRE, 2020

Dissertação foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no dia 06 de abril de 2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Andreza Francisco Martins  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dr. Leandro Reus Rodrigues Perez  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

#### CIP - Catalogação na Publicação

Pancotto, Lisiane Rech  
Caracterização Molecular de Isolados de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes às Polimixinas / Lisiane Rech  
Pancotto. -- 2020.  
69 f.  
Orientador: Afonso Luis Barth.  
  
Coorientadora: Juliana Caierão.  
  
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.  
  
1. Resistência Bacteriana. 2. Polimixina. 3. mgrB.  
I. Barth, Afonso Luis, orient. II. Caierão, Juliana, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com o apoio financeiro do Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE-HCPA) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Afonso, por ter me orientado desde a iniciação científica e ter aberto as portas para o mundo da microbiologia para mim. Obrigada pela paciência, por todas as oportunidades e todo o ensinamento.

À minha co-orientadora Juliana, por ter me ajudado desde o início com a escolha do tema do meu trabalho, no decorrer com as discussões sobre os resultados e ao fim, na escrita da dissertação.

Aos meus colegas do LABRESIS, por todos os momentos e cafés compartilhados. Agradeço à Daiana e à Priscila pela ajuda com os sequenciamentos, e especialmente à Daiana, que foi extremamente importante no auxílio da análise dos dados obtidos.

Aos meus colegas do Laboratório de Análises Clínicas Carlos Franco Voegeli da Santa Casa de Porto Alegre. À Maiara, que mesmo estando longe nos últimos meses para cuidar do Miguel nunca deixou de estar perto, à Camila, por ter me trazido tranquilidade nesses últimos meses, e também ao Everton, pelo ensinamento diário.

À todas as amigas que a vida me deu, Aline, Jéssica, Melina, Raíssa, Raylane, Rianne, Sheila, e em especial à Sabrina que passou por esse momento junto comigo. Juntas somos muito mais fortes, espero continuar compartilhando a vida com vocês! Ao Rafael, muito obrigada por todo o apoio e companheirismo nesses anos.

Por fim, à minha família que sempre me mostrou a importância dos estudos e me apoiou nas minhas decisões. Minha mãe, meu pai, minha mana, Tuco, minha vó e minha dinda, eu amo vocês, vocês são os meus maiores exemplos!





## RESUMO

Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes às polimixinas, com foco em alterações cromossômicas. Um total de 35 isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e a polimixina B de 3 hospitais em Porto Alegre no período de abril de 2013 a agosto de 2015 foram incluídos no estudo. Todos os 35 isolados de *K. pneumoniae* apresentaram os genes *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* e *phoQ* com o tamanho molecular esperado, indicando que nenhuma deleção ou inserção parcial ocorreu nesses genes. Nenhum dos isolados apresentou reação de PCR positiva para o gene *mcr-1*. A PCR para o gene *mgrB* foi positiva em 34 dos 35 isolados avaliados sendo que 23 isolados apresentaram o gene com o tamanho de aproximadamente 144 pares de base indicando que o mesmo estava intacto. Por outro lado, 11 isolados de *K. pneumoniae* (32,4%) apresentaram amplicons de *mgrB* com tamanho aumentado (em torno de 1500 bp), o que é compatível com a presença de IS. Um isolado apresentou resultado negativo na PCR para o gene *mgrB*, sugerindo deleção total do gene.

Os 12 isolados resistentes aos carbapenêmicos e polimixina B com alteração no gene cromossômico *mgrB* tiveram seu genoma completo sequenciado. Os dados do sequenciamento foram processados e analisados com a utilização de ferramentas de bioinformática apropriadas (<https://patricbrc.org>; <http://www.genomicepidemiology.org>; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), sendo comparados com sequências de referências depositadas. Genes relatados como responsáveis pela resistência à polimixina, como *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* e *phoQ* foram também analisados com os dados gerados pelo sequenciamento de todo genoma.

Os 11 isolados clínicos com *mgrB* alterado (amplicon com tamanho molecular aumentado) tiveram seus dados de NGS analisados na plataforma National Center for Biotechnology Information (NCBI) por similaridade a sequências de referências. Desta forma, foi possível identificar 5 famílias diferentes de IS: 5 isolados interrompidos por sequências da família IS5 (45,5%), 3 isolados da família ISKpn13 (27,3%) e 1 isolado das respectivas famílias: IS1, IS3 e ISKpn26. Um único isolado não mostrou amplificação do gene *mgrB*, sendo

posteriormente confirmado a deleção por sequenciamento do genoma completo. Conforme nosso conhecimento, esses são os primeiros relatos de inserção de IS3, além de deleção total mutando o gene *mgrB*, em isolados provenientes do Brasil.

Embora os resultados da técnica de PCR com primers para os outros genes relacionados a resistência cromossomal à polimixina (*pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* e *phoQ*) tenha indicado que todos estavam presentes e que não apresentavam alteração no tamanho molecular, foi possível identificar mutações missense e silenciosas através da análise dos dados de sequenciamento do genoma completo. As mutações encontradas incluíram: *pmrA* – missense mutation no isolado 4110 (L64R, D167E); *pmrB* – mutação missense no isolado 966 (S164P) e isolado 3854 (V300F), mutações missense e silenciosa no isolado 4110 (A84G, G111V, P145P, L233L); *pmrD* – mutação silenciosa (L25L); e *phoQ* – mutação silenciosa no isolado 4110 (I148I, S301S, D416D).

Além de genes relacionados a resistência à polimixina, outros genes foram identificados a partir da análise in silico dos dados do sequenciamento de todo genoma: *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* (resultado esperado visto que os isolados eram resistentes aos carbapenêmicos), enzimas modificadoras de aminoglicosídeos incluindo acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases; genes *tet* que conferem resistência a tetraciclinas bem como *bla<sub>CTX-M</sub>* que confere resistência a beta-lactâmicos. Os dados de sequenciamento confirmaram que nenhum isolado apresentava o gene *mcr-1*.

Para determinar a sequence type (ST) dos isolados, os sete genes housekeeping (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *ton*) foram avaliados in silico. Foram identificadas 4 diferentes STs, 6 isolados pertenciam a ST437 (50,0%), 4 isolados a ST11 (33,3%), 1 isolado a ST16 e 1 a ST340 (8,3%).

Nossos resultados corroboraram com relatos anteriores sobre a resistência, mas também indicaram a complexidade que pode estar envolvida, muitas vezes tendo mais de um mecanismo envolvido na resistência. Cabe mencionar que um isolado com o gene *mgrB* com deleção total e um isolado com sequência de inserção IS3 alterando o gene, ambas as alterações não descritas anteriormente no Brasil.

**Palavras Chaves:** Resistência bacteriana; Polimixina; *mgrB*.

## ABSTRACT

This study aimed to carry out the molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to polymyxins, focusing on chromosomal alterations. A total of 35 clinical isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems and polymyxin B from 3 hospitals in Porto Alegre from April 2013 to August 2015 were included in the study. All 35 isolates of *K. pneumoniae* had the *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* and *phoQ* genes with the expected molecular size, indicating that no deletion or partial insertion occurred in these genes. None of the isolates showed a positive PCR reaction for the *mcr-1* gene. The PCR for the *mgrB* gene was positive in 34 of the 35 isolates evaluated, with 23 isolates presenting the gene with the size of approximately 144 base pairs indicating that it was intact. On the other hand, 11 (32.4%) isolates of *K. pneumoniae* presented increased *mgrB* amplicons (around 1500 bp), which is compatible with the presence of IS. One isolate had a negative PCR result for the *mgrB* gene, suggesting complete deletion of the gene.

The 12 isolates resistant to carbapenems and polymyxin B with changes in the chromosomal gene *mgrB* had their genome all sequenced. The sequencing data were processed and analyzed using appropriate bioinformatics tools (<https://patricbrc.org>; <http://www.genomicepidemiology.org>; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), being compared with deposited reference strings. Genes reported to be responsible for polymyxin resistance, such as *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* and *phoQ* were also analyzed with the data generated by sequencing the entire genome.

The 11 clinical isolates with altered *mgrB* (amplicon with increased molecular size) had their NGS data analyzed on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) platform for similarity to the reference sequences. Thus, it was possible to identify 5 different IS families: 5 isolates interrupted by IS5 family sequences (45.5%), 3 isolates from the ISKpn13 family (27.3%) and 1 isolate from the respective families: IS1, IS3 and ISKpn26. A single isolate did not show amplification of the *mgrB* gene, and the deletion was confirmed by sequencing the complete genome. To our knowledge, these are the first reports of insertion of IS3 and total deletion mutating the *mgrB* gene, in isolates from Brazil.

Although the results of the PCR technique with primers for the other genes related to chromosomal resistance to polymyxin (*pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* and *phoQ*) indicated that all were present and that there was no change in molecular size, it was possible to identify *missense* mutations and silent by analyzing the complete genome sequencing data. The mutations found included: *pmrA* - *missense* mutation in isolate 4110 (L64R, D167E); *pmrB* - *missense* mutation in isolate 966 (S164P) and isolate 3854 (V300F), *missense* and silent mutations in isolate 4110 (A84G, G111V, P145P, L233L); *pmrD* - silent mutation (L25L); and *phoQ* - silent mutation in isolate 4110 (I148I, S301S, D416D).

In addition to genes related to polymyxin resistance, other genes were identified from in silico analysis of sequencing data for the entire genome: *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>NDM</sub> (expected result since the isolates were resistant to carbapenems), aminoglycoside-modifying enzymes including acetyltransferases, phosphotransferases and nucleotidyltransferases; *tet* genes that confer resistance to tetracyclines as well as *bla*<sub>CTX-M</sub> that confers resistance to beta-lactams. The sequencing data confirmed that no isolate had the *mcr-1* gene.

To determine the sequence type (ST) of the isolates, the seven housekeeping genes (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* and *ton*) were evaluated in silico. Four different STs were identified, 6 isolates belonging to ST437 (50.0%), 4 isolates to ST11 (33.3%), 1 isolate to ST16 and 1 to ST340 (8.3%).

Our results corroborate previous reports on resistance, but they also indicated the complexity that may be involved, often having more than one mechanism involved in resistance. It is worth mentioning that an isolate with the *mgrB* gene with total deletion and an isolate with an IS3 insertion sequence altering the gene, both alterations not previously described in Brazil.

**Key words:** Antimicrobial resistance; Polymyxin; *mgrB*.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFB	Ácido Fenilborônico
AME	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
bp	pares de base
CC	Clonal Complex
CRE	<i>Enterobacterales</i> Resistentes aos Carbapenêmicos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
IS	Insertion Sequence
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
KpCR	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Resistente aos Carbapenêmicos
L-Ara4N	4-amino-4-deoxi-L-arabinose
LPS	Lipopolissacarídeo
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MLST	Multilocus Sequence Typing
NDM	New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase
NGS	Next-Generation Sequencing
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEtN	Fosfoetanolamina
RNA	Ácido Ribonucleico
ST	Sequence Type
WGS	Whole Genome Sequencing



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. OBJETIVOS .....	19
2.1. Objetivo Geral .....	21
2.2. Objetivos Específicos .....	21
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	23
3.1. Ordem Enterobacterales .....	25
3.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	26
3.3. Polimixina .....	27
3.4. Resistência à polimixina .....	28
3.4.1 Resistência à polimixina em <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	28
3.5. Avaliação da diversidade genética .....	31
3.6. Ferramentas de sequenciamento .....	33
4. MANUSCRITO .....	35
5. DISCUSSÃO .....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61





## 1. INTRODUÇÃO



A resistência antimicrobiana tem sido amplamente reportada em bacilos Gram negativos para diversas classes de antibióticos, sendo que estas bactérias podem se tornar multirresistentes (Partridge, S. R., 2015). Dentre esses germes, os de maior importância clínica pertencem a ordem Enterobacterales, e em pesquisa publicada em 2013 pelo European Centre for Disease Prevention and Control, *Klebsiella pneumoniae* foi reportada como uma das principais espécies de Enterobacterales descritas como multirresistente ao redor do mundo (ECDC, 2013).

As opções para o tratamento de *K. pneumoniae* com fenótipo resistente são restritas, por isso carbapenêmicos, amicacina, tigeciclina são drogas atualmente consideradas como “última opção de tratamento” (Karaiskos *et al.*, 2019). A emergência de *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (CRE), fez com as polimixinas fossem reinseridas na prática clínica mesmo com os seus efeitos nefrotóxico e neurotóxico (Evans *et al.*, 1999). Polimixinas são antibióticos polipeptídeos catiônicos cujos principais representantes diferem em apenas um aminoácido: polimixina E ou colistina (possui D-fenilalanina) e polimixina B (possui um resíduo D-leucina) (Biswas, 2012). Ambas interagem com o lipopolissacarídeo da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas. Polimixinas são utilizadas no tratamento de bactérias multirresistentes em combinação com carbapenêmicos, aminoglicosídeos e tigeciclina (Karaiskos *et al.*, 2019).

Entretanto, o crescente uso de polimixina fez com que surgissem relatos de resistência, podendo ser decorrente de alterações no cromossoma da bactéria (Cannatelli *et al.*, 2013), ou pela aquisição de genes de resistência localizados em elementos genéticos móveis (plasmidial) (Liu *et al.*, 2015). De fato, as alterações (mutações) cromossomais são mais prevalentes que plasmidiais em isolados de *K. pneumoniae* com resistência mais significativa as polomixinas, ou seja, com altos valores de concentração inibitória mínima (MIC). Entre as mutações cromossomais, a alteração no gene *mgrB* é a mais comum sendo que o mecanismo envolvido é principalmente a inserção de sequências no gene, tornando-o não funcional e impossibilitando a regulação de um complexo sistema de dois componentes (Cannatelli *et al.*, 2014), permitindo modificação do lipopolissacarídeo (LPS) após a adição de 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ao lipídeo A, diminuindo, portanto, a afinidade das

polimixinas ao LPS pela diminuição da carga negativa da membrana (Ezadi *et al.*, 2019).

Além de sequências de inserção (IS) alterando o gene *mgrB*, outros mecanismos já foram relatados, como a deleção total do gene *mgrB*, que embora seja descrita com menos frequência em comparação com IS, também confere altos níveis de resistência à polimixina (Cannatelli *et al.*, 2014). Além da deleção, mutações nos genes *pmrA*, *pmrB*, *phoP* e *phoQ*, que compõem o sistema de dois componentes têm sido indicadas como alterações responsáveis pela resistência a polimixina, visto que também resultam na modificação no LPS e impossibilidade de ligação da polimixina à membrana celular externa (Macesic *et al.*, 2019).

É importante conhecer o *background* genético dos isolados para verificar possíveis determinantes de resistência, sendo assim, métodos moleculares como Sequenciamento do Genoma Completo (NGS) se tornam essenciais para elucidar a resistência à polimixina. Com isso, o objetivo do nosso trabalho foi elucidar o ambiente genético de isolados de *K. pneumoniae* resistentes à polimixina.

## **2. OBJETIVOS**



**2.1 Objetivo Geral:**

Caracterização molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes às polimixinas, recuperados de pacientes atendidos em hospitais de Porto Alegre.

**2.2 Objetivos Específicos:**

Avaliar a presença de alterações no gene *mgrB*, e nos demais genes relacionados à resistência às polimixinas;

Avaliar a diversidade genética dos isolados resistentes às polimixinas.





### **3. REVISÃO DA LITERATURA**



### 3.1 Ordem *Enterobacterales*

A ordem *Enterobacterales* compreende bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos e não formadores de esporos, que se dividem em 60 gêneros e mais de 250 espécies. Dentre as famílias que compõem tal ordem, *Enterobacteriaceae* é a que apresenta as espécies mais frequentemente associadas a infecções comunitárias e infecções nosocomiais graves, especialmente quando associadas à aquisição de determinantes de resistência (Adeolu *et al.*, 2016).

Para esses microrganismos, a resistência antimicrobiana tem sido reportada para diversas classes de antibióticos, o que restringe as opções de tratamento. Os membros da ordem *Enterobacterales* podem adquirir resistência aos antimicrobianos por quatro mecanismos fundamentais: alteração na permeabilidade de membrana a um determinado composto; alteração no sítio-alvo do antimicrobiano; hiperprodução de sistemas de efluxo e produção de enzimas capazes de inativar fármacos (Allen *et al.*, 2010). A resistência aos carbapenêmicos é a mais importante no caráter epidemiológico e o fenótipo de resistência que mais impacta clinicamente, aumentando significativamente morbidade e mortalidade associadas a essas infecções (Capone *et al.*, 2014).

Carbapenêmicos, (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem, etc.) têm seu mecanismo de ação relacionado à inibição da síntese de peptidoglicano através da ligação a Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP), culminando em um efeito bactericida (Breilh *et al.*, 2013). O mecanismo de resistência aos carbapenêmicos com maior relevância clínica e epidemiológica é a produção de enzimas, as carbapenemases, que se dividem em 3 classes. Enzimas da classe A possuem um resíduo de serina no sítio-ativo e são inibidas pelo ácido fenilborônico (AFB); a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) é o principal exemplo de enzimas que compõem essa classe. Por sua vez, as enzimas de classe B são caracterizadas por possuírem um resíduo de zinco no sítio ativo e são inibidas por agentes quelantes, como o Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sendo a enzima New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) a de maior importância clínica e epidemiológica dentro do grupo. Por fim, as enzimas de classe D – oxacilinases – têm menor capacidade hidrolítica sobre carbapenêmicos, sendo a OXA-48 uma das principais carbapenemases dessa classe (Ambler *et al.*, 1980).

A presença dessas enzimas, isoladas ou associadas a outros mecanismos de resistência, caracteriza germes multirresistentes (GMR), para os quais as opções terapêuticas são limitadas. De fato, o tratamento de infecções causadas por *Enterobacterales* Resistentes aos Carbapenêmicos (CRE) é desafiador e fundamenta-se na combinação de diferentes classes: essencialmente, são utilizadas polimixinas associadas a aminoglicosídeos, tigeciclina ou carbapenêmicos (Peri *et al.*, 2019). Representados clinicamente por estreptomicina, amicacina e gentamicina, os aminoglicosídeos atuam ligando-se irreversivelmente à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, inibindo a síntese proteica (Serio *et al.*, 2018). As bactérias se tornam resistentes a esses antimicrobianos através da alteração no sítio de ligação da droga ou, principalmente, pela inativação do antimicrobiano, pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME). Tais enzimas são codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis, sendo, portanto, facilmente dissemináveis (Doi *et al.*, 2016; Ramirez *et al.*, 2010). As AMEs são classificadas de acordo com a molécula que utilizam para modificar os fármacos, podendo ser acetiltransferases (AAC), fosfotransferases (APH) e nucleotidiltransferases (ANTs ou AADs). Acetiltransferases do tipo *aac(6')-Ib-cr* são especialmente importantes pois conferem resistência também aos antibióticos da classe das quinolonas (Robicsek *et al.*, 2006).

### 3.2 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* pertence à ordem *Enterobacterales*, compondo a família *Enterobacteriaceae*, sendo *Klebsiella pneumoniae* a principal espécie do gênero. Dados publicados em 2013 pelo European Centre for Disease Prevention and Control, reportou *K. pneumoniae* como uma das principais espécies de *Enterobacterales* multirresistentes reportados ao redor do mundo (ECDC, 2013). A elevada prevalência dessa espécie em infecções humanas associada à alta frequência de isolamento de cepas multirresistentes e à facilidade de disseminação de determinados grupos clonais reforça a importância da *K. pneumoniae* no cenário mundial (Munoz-Price *et al.*, 2013).

Diversos são os antibióticos para o tratamento de *Klebsiella pneumoniae*, em especial as cepas mais resistentes, sendo que carbapenêmicos, aminoglicosídeos e tigeciclina são drogas atualmente

consideradas como “última opção de tratamento”. Com o aumento do uso desses antibióticos tem se evidenciado, no entanto, o surgimento de relatos de microrganismos resistentes à todas as classes de antibióticos, e ainda à polimixina, o que impacta diretamente na atual indicação terapêutica, visto que a polimixina é atualmente indicada para uso em tratamento combinado com carbapenêmicos, tigeciclina ou aminoglicosídeos. (Cannatelli *et al.*, 2013; Olaitan *et al.*, 2014; Bassetti *et al.*, 2018; Karaiskos *et al.*, 2019). Em casos de resistência à polimixina, novos fármacos, mas com mecanismos de ação tradicionais, como Ceftazidime-Avibactam, Meropenem-Vaborbactam, Plazomicina e Eravaciclina estão sendo utilizados na clínica médica como opção de tratamento (Karaiskos *et al.*, 2019).

### 3.3 Polimixinas

Em 1947, foi isolado de *Paenibacillus polymyxa* o composto atualmente conhecido como polimixina B, enquanto a colistina (polimixina E) foi isolada em 1949, a partir de *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus*. Em 1950, as polimixinas foram inicialmente utilizadas clinicamente no Japão e na Europa, e em 1959, a colistina E, na forma de uma pró-droga (colistimetato de sódio), foi utilizada para tratar infecções por bacilos Gram-negativos nos Estados Unidos. Entretanto, na década de 1980, a utilização clínica das polimixinas foi consideravelmente reduzida, já que elas apresentavam uma toxicidade expressiva, especialmente nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Ezadi *et al.*, 2019). Assim, essa classe foi rapidamente substituída por antimicrobianos de menor toxicidade. Contudo, com o aumento da disseminação de bactérias multirresistentes na década de 90, especialmente as CRE, a escassez de antimicrobianos eficazes justificou o retorno das polimixinas como opção de tratamento (Ezadi *et al.*, 2019).

As polimixinas são antibióticos polipeptídeos catiônicos que diferem em somente um aminoácido: a colistina (polimixina E) possui D-Fenilalanina na posição 6 da molécula, enquanto a polimixina B possui um resíduo D-Leucina (Biswas *et al.*, 2012). Consistem em um heptapeptídeo, um segmento tripeptídico linear e uma cauda de ácido graxo, possibilitando a existência de regiões com caráter hidrofóbico e hidrofílico, essencial para a sua atividade

antimicrobiana, permitindo a interação com o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas (Ezadi *et al.*, 2019).

As polimixinas interagem com a membrana externa das bactérias Gram-negativas e devido a sua carga positiva, se ligam aos grupos fosfato negativamente carregados do lipídeo A do LPS. Com isso, deslocam os cátions divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e desestabilizam o LPS, consequentemente alterando a permeabilidade da parede celular e levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e lise bacteriana (Biswas *et al.*, 2012).

### 3.4 Resistência à polimixina

As bactérias podem se tornar resistentes às polimixinas empregando estratégias que incluem: (i) alterações no lipopolissacarídeo (LPS), levando a modificações na fração de lipídeo A por meio de adição de grupamentos 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) e fosfoetanolamina (PEtN) e consequente redução da carga negativa; (ii) utilização de sistemas de efluxo para expelir o antibiótico para o meio externo da célula; e (iii) formação de cápsulas, impedindo a ligação do antibiótico à parede celular. Dentre esses, o mecanismo mais importante é a adição dos grupamentos químicos no Lipídeo A e isso ocorre em consequência de mutações em genes cromossômicos ou por aquisição de genes plasmidiais (*mcr*) (Campos *et al.*, 2004; Raetz *et al.*, 2007; Padilla *et al.*, 2010).

#### 3.4.1 Resistência às polimixinas em *K. pneumoniae*

O principal mecanismo cromossômico de resistência às polimixinas em *K. pneumoniae* é mediado pela modificação do LPS após a adição de 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N) ao lipídeo A, que diminui a afinidade das polimixinas ao LPS, já que reduz a carga negativa da membrana a praticamente zero. Esta modificação depende de produtos do operon *pmrHF/JKLM* – também chamado de *arn* – que é regulado positivamente pelos sistemas de sinalização de dois componentes PhoQ/PhoP e PmrA/PmrB (Helander *et al.*, 1996; Olaitan *et al.*, 2014). A ativação do sistema de sinalização PhoQ/PhoP induz a produção da proteína transmembrana MgrB, que exerce feedback negativo no sistema de sinalização por interação direta com a quinase, controlando a fosforilação de PhoP e a ativação do sistema de sinalização de dois componentes PmrA/PmrB

(Lippa e Goulian, 2009). A inativação do gene *mgrB*, que ocorre majoritariamente pela inserção de sequências específicas no gene, levando a uma indução constitutiva do sistema de dois componentes PhoP/PhoQ e consequente regulação positiva do operon *pmrHFIKLM*, que altera o LPS através da adição de L-Ara4N. Já, a indução constitutiva do sistema de dois componentes por mutação nos sistemas PmrA/PmrB e consequente regulação positiva do operon *pmrCAB* altera o LPS através da adição de PEtN ao lipídeo A (Olaitan, 2014).

As sequências de inserção (IS) que, quando inseridas no gene *mgrB*, alteram a sua função são elementos transponíveis muito simples, os quais não carregam nenhuma outra informação genética além da necessária à sua inserção em um local determinado. Assim, as IS são compostas por genes que codificam uma transposase e duas pequenas sequências de repetições terminais, uma direta e outra invertida, localizadas nas extremidades da transposase. As IS encontram-se distribuídas ao longo do cromossomo, variando na frequência com que são encontradas, podendo estar presente em diversas cópias em um único cromossomo (Schleinitz *et al.*, 2010).

A inativação de gene *mgrB* por uma IS é um importante mecanismo associado a resistência à polimixina (Cannatelli *et al.*, 2014). Macesic e colaboradores (2019) demonstraram que 24,4% de isolados de *K. pneumoniae* resistentes as polimixinas apresentaram alteração no gene *mgrB* causado por inserção de IS. Dentre as sequências que interrompem o gene *mgrB*, IS5 é a mais comumente relatada, tendo sido isolada em diversos países, incluindo o Brasil (Aires *et al.*, 2016; Cannatelli *et al.*, 2014; Lomonaco *et al.*, 2018).

Outras IS também têm sido relatadas em estudos de caracterização molecular do gene *mgrB*. ISKpn13 foi descrita em isolados recuperados na França, Turquia, Colômbia e África do Sul (Poirel *et al.*, 2014), mas também em isolados de *K. pneumoniae* recuperados na Grécia e no Brasil (Pitt *et al.*, 2018). Uma sequência da família IS1 foi descrita em 2018 por Uz Zaman e colaboradores na Arábia Saudita e, no mesmo ano, no Sul do Brasil, por Zavascki e colaboradores. Por sua vez, genes *mgrB* interrompidos por IS903 já foram descritos na Arábia Saudita (Uz Zaman *et al.*, 2018), Itália (Esposito *et al.*, 2018) e Brasil (Aires *et al.*, 2016). De fato, juntamente com a IS5, IS903 parece ser a mais frequentemente presente em isolados brasileiros de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (Aires *et al.*, 2016).

IS3, ISKpn14, ISKpn18, ISKpn25, ISKpn26 e ISKpn28 também já foram relatadas mundialmente, embora com menos frequência, causando inativação do gene *mgrB*, e consequente resistência à polimixina (Halaby *et al.*, 2016; Uz Zaman *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2018; Pitt *et al.*, 2018; Lomonaco *et al.*, 2018; Aires *et al.*, 2016).

A presença de IS não é a única alteração no gene *mgrB* capaz de levar à resistência às polimixinas. Há, por exemplo, relatos de deleção total do *mgrB*, levando, obviamente à resistência a esses antibióticos (Cannatelli *et al.*, 2013; Giani *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2017; Bernasconi *et al.*, 2018; Macesic *et al.*, 2019).

Embora as alterações no *mgrB* sejam o principal mecanismo observado em *K. pneumoniae*, a resistência às polimixinas pode ocorrer devido a alterações em qualquer um dos demais genes envolvidos nas modificações do LPS, incluindo os genes dos sistemas de dois componentes – *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP* e *phoQ* – que levariam a uma ativação constitutiva dos operons associados a inserção de grupos positivos no lipídeo A, resultando em modificação no LPS (Olaitan *et al.*, 2014). De fato, mutações nos genes dos sistemas de dois componentes já foram relatadas por diversos autores. Haeili e colaboradores (2017) por exemplo, relataram mutações *missense* no gene *pmrB* em 19 de 20 isolados pesquisados. Pitt e colaboradores publicaram em 2018 um estudo com isolados resistentes às polimixinas provenientes do Brasil e da Grécia e encontraram mutações nos genes *pmrA*, *pmrB*, *phoP* e *phoQ* de *K. pneumoniae*. Resultados semelhantes foram relatados por Yang e colaboradores (2018) e Xiaoliang e colaboradores (2019).

Macesic e colaboradores publicaram em 2019 um grande estudo realizando o sequenciamento do genoma completo de 388 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de um hospital terciário localizado na cidade de Nova York, nos Estados Unidos, sendo 164 isolados resistentes à polimixina. Esses autores encontraram diversas mutações *missense*, *nonsense* e *neutras* em todos os sistemas de dois componentes – *pmrA*, *pmrB*, *phoP* e *phoQ*. No Brasil, as principais mutações associadas aos genes são: *pmrA* (E57G), *pmrB* (R256G e T246A) e *phoP* (A30S) (Aires *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2019).

Para além de todas essas complexas modificações em genes cromossômicos, a resistência às polimixinas pode, também, estar associada a



presença de genes localizados em plasmídeos. É o caso do gene *mcr-1*, que foi reportado inicialmente em novembro de 2015 por Liu e colaboradores em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* recuperados de animais e de humanos de provenientes da China (Liu *et al.*, 2015). Já em junho de 2016, foi relatado na Bélgica a existência do gene *mcr-2* em isolados bacterianos de animais (Xavier *et al.*, 2016). Desde então, até 2020, foram relatadas oito variantes do gene *mcr*: *mcr-1*, *mcr-3*, *mcr-7* e *mcr-8*, descritos pela primeira vez na China (Liu *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018), *mcr-2*, relatado inicialmente na Bélgica (Xavier *et al.*, 2016), *mcr-4* na Itália, Espanha e Bélgica (Carattoli *et al.*, 2017) e *mcr-6*, na Grã-Bretanha (AbuOun *et al.*, 2017). MCR é uma proteína da família de enzimas transferases que adiciona um grupo fosfoetanolamina ao lipídeo A. Por estar localizado em um elemento genético móvel e poder ser transferido horizontalmente, o gene *mcr* dissemina-se rapidamente e já foi reportado mundialmente (Gao *et al.*, 2016; Irrgang *et al.*, 2016; Prim *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016; Ellem *et al.*, 2017). Os genes *mcr* estão associados a plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade. Inicialmente, o gene *mcr-1* foi descrito no grupo de plasmídeos IncI2, porém, estudos posteriores indicaram que o gene *mcr-1* não é restrito apenas a esse grupo plasmidial, sendo encontrado também em IncX4, IncHI2, IncI2, IncHI1 e pO111 (Hasman *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020).

### 3.5 Avaliação da diversidade genética

A disseminação de microrganismos multirresistentes pode ocorrer pela expansão clonal de linhagens específicas (disseminação clonal), ou através do compartilhamento de material genético ou alterações cromossômicas ocorrendo em isolados bacterianos com *background* genéticos distintos. Nesse último caso, há uma diversidade genética considerável entre os isolados compartilhando entre si poucas características, além do fenótipo de resistência (Urwin, R. and Maiden, M. C., 2003).

Uma das ferramentas utilizadas para avaliar a diversidade genética de isolados é o MLST, o qual tem como vantagens a não ambiguidade de dados e a capacidade de comparação com dados mundiais, através do compartilhamento de informações em bancos de dados (Maiden *et al.*, 1998)

A partir da técnica convencional de MLST, é definida a Sequence Type (ST) da qual faz parte a bactéria em questão. As STs são definidas pela avaliação dos alelos de genes *housekeeping*. Estes genes são amplificados e sequenciados individualmente e isso permite definir os diferentes tipos de sequências que caracterizam um determinado perfil alélico (ou ST) de isolados de uma mesma espécie (Maiden *et al.*, 1998; Urwin *et al.*, 2003). A determinação de ST também pode ser feita pela avaliação *in silico* dos dados obtidos no sequenciamento de todo o genoma bacteriano (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

Para *K. pneumoniae* são 7 genes avaliados para determinação das STs, sendo eles: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *ton* (<http://www.genomicepidemiology.org/>). STs semelhantes agrupam-se num mesmo complexo clonal (CC).

O CC258, por exemplo, tem disseminação e importância mundiais, uma vez que já foi descrito nas mais diferentes regiões geográficas e que está relacionado a isolados de *K. pneumoniae* multirresistentes. Esse CC é composto pelas seguintes STs: ST 258, ST11, ST340 e ST512 (Peirano *et al.*, 2017).

A ST11 foi relatada na China em 2017 por Zhang e colaboradores, associada à disseminação de uma cepa de *K. pneumoniae* produtora da *bla*<sub>KPC-2</sub>, e em 2019 por Xiaoliang e colaboradores, associada a morte de um paciente com infecção de corrente sanguínea por um isolado de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e à polimixina. Pitt e colaboradores (2018) sequenciaram isolados provenientes do Brasil e encontraram cepas pertencentes a ST11, além da ST437. Boszczowski e colaboradores (2019) reportaram um isolado de *K. pneumoniae* resistente a polimixina pertencente à ST 340 proveniente de um hospital terciário na cidade de São Paulo.

Macesic e colaboradores encontraram uma alta prevalência do CC258, sendo a ST258 presente em 301 dos 388 isolados pesquisados, e ainda, ST17 ST307 e ST392 sendo outras STs de importante incidência (Macesic *et al.*, 2019).

A ST16 foi recentemente descrita em um caso de disseminação clonal em São Paulo, como sendo uma ST importante na disseminação de um clone de alto risco associado a resistência à polimixina, embora não tendo relação com o CC258 (Andrey *et al.*, 2019).

### 3.6 Ferramentas de Sequenciamento

O sequenciamento de genes bacterianos permite, dentre outros, avaliar a presença de alterações, tais como mutações ou presença de IS. Ao longo das últimas décadas, foi observado um avanço significativo nas metodologias de sequenciamento.

Primeiramente, em meados da década de 70, foi desenvolvido o método de dideoxi de Sanger, o qual se baseia em uma metodologia enzimática, onde são gerados fragmentos de DNA de tamanhos variados, marcados com fósforo, que são, posteriormente, submetidos à eletroforese em gel. A técnica exige iniciadores com sequências conhecidas e as plataformas disponíveis para o sequenciamento de Sanger são MegaBACE (Amersham Biosciences) e ABI Prism (Applied Biosystems) (França *et al.*, 2002).

Posteriormente, o sequenciamento foi aprimorado, aumentando o volume de dados fornecido em uma única corrida de sequenciamento e reduzindo o custo em comparação com o volume de dados gerados no sequenciamento de Sanger. O sequenciamento de nova geração (NGS), também conhecido como Sequenciamento de Segunda Geração, baseia-se na obtenção de uma biblioteca genômica para sequenciar o genoma completo, a biblioteca é composta por pequenos fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) da amostra a ser sequenciada. A seguir, a amplificação desses fragmentos é realizada através de PCR em emulsão, utilizando-se um único par de iniciadores e o sequenciamento simultâneo destes produtos de amplificação. Ao final, os fragmentos são montados por referência ou “de novo”. Na montagem por referência, utiliza-se um genoma conhecido, sendo as reads obtidas através do sequenciamento, alinhadas contra o genoma de referência. Na montagem “de novo”, não existe uma referência e as reads são montadas por similaridade (Bentley *et al.*, 2008).

Diversas plataformas de NGS estão disponíveis, e o que as diferencia é a tecnologia utilizada para a detecção da incorporação de novos nucleotídeos e o tamanho do fragmento sequenciado. A plataforma 454 (Roche) utiliza o pirosequenciamento baseado em reações de fluorescência para a detecção da incorporação de nucleotídeos. O MiSeq (Illumina) utiliza o sequenciamento baseado em síntese, utilizando marcação com fluoróforos para a detecção das

diferentes bases incorporadas. A plataforma Ion Torrent (ThermoFisher) se baseia na modificação de pH causada pela incorporação de nucleotídeos à cadeia e consequente liberação de íons  $H^+$  (Pareek *et al.*, 2011).

A terceira e quarta gerações de sequenciamento são respectivamente representadas pelas plataformas PacBio e Nanopore. A tecnologia PacBio utiliza sequenciamento por síntese, enquanto a tecnologia Nanopore utiliza sinal elétrico para detecção das bases incorporadas. Rapidez, precisão e versatilidade são as principais vantagens fornecidas pelas novas plataformas de sequenciamento.





O texto completo do capítulo 4, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 37 – 54, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta na descrição de alterações cromossômicas em isolados de *Klebsiella pneumoniae* frequentemente relacionadas com o mecanismo de resistência à polimixina na espécie *K. pneumoniae*. Os isolados foram sequenciados através de Sequenciamento de Sanger e Sequenciamento de Nova Geração e foram analisados com o uso de ferramentas de bioinformática.









































## **5. DISCUSSÃO**



Apesar da toxicidade preocupante e bem reconhecida das polimixinas, elas continuam a ser usadas como drogas de última linha para o tratamento da CRE. No entanto, a resistência à polimixina tem sido descrita em todo o mundo e agrava ainda mais a situação (Olaitan et al., 2014).

Alteração no gene *mgrB* é o mecanismo mais frequentemente relatado causando resistência à polimixina em *Klebsiella pneumoniae*, e a alteração mais frequente é a inserção de diferentes tipos de elementos móveis, como as sequências de inserção (IS) (Cannatelli et al., 2014; Macesic et al., 2019). Em nosso estudo, o *mgrB* de 31,4% dos isolados resistentes à polimixina B eram interrompidos pela inserção de IS.

Diversas IS já foram relatadas no *mgrB* de *K. pneumoniae*, no entanto, IS5 é a sequência mais frequentemente relatada no Brasil e no mundo (Cannatelli et al., 2014; Aires et al., 2016; Lomonaco et al., 2018), o que também observamos no nosso : 45,5% e em um período mais longo de tempo – 17 meses – e em todos os hospitais, demonstrando a sua estabilidade como sequência de inserção e capacidade de disseminação. ISKpn13 foi a segunda IS mais frequente em nosso estudo, sendo identificada em três isolados (27,3%). A sequência já havia sido relatada por Pitt e colaboradores (2018) em um estudo com amostras provenientes do Brasil, demonstrando que a sequência já havia sido encontrada no país (Pitt et al., 2018). A sequência IS1 foi identificada em apenas um isolado em nosso estudo (9,1%) e já havia sido relatada inserida no *mgrB* de *K. pneumoniae* no sul do Brasil no ano de 2018 (Zavascki et al., 2018). ISKpn26 também foi relatada em apenas um isolado em nosso estudo, demonstrando sua baixa prevalência, entretanto, já havia sido reportada no Brasil (Pitt et al., 2018). Da mesma forma, a sequência IS3 foi identificada em apenas um isolado, e embora já tenha sido relatada em Amsterdam (Halaby et al., 2016), este é o primeiro relato de IS3 inserida em *mgrB* em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil.

Um isolado não apresentou amplificação no gene *mgrB*, sendo esse resultado posteriormente confirmado no NGS visto que não foi possível identificar esse gene a partir da análise in silico de todo o genoma. De fato, há relatos em que a resistência pode estar associada a deleção total do gene *mgrB* com consequente não regulação dos sistemas de dois componentes e alteração

no LPS, impedindo a ligação da polimixina (Cannatelli *et al.* 2013; Giani *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2017; Bernasconi *et al.*, 2018; Macesic *et al.*, 2019).

Além disso, mutações pontuais *nonsense*, *missense*, deleções (pequenas ou grandes) em genes relacionados com o sistema de dois componentes regulado pelo *mgrB* (*pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*) podem estar associadas a resistência à polimixina em isolados de *K. pneumoniae*. Em nosso estudo, encontramos mutações ainda não descritas anteriormente em 25% dos isolados, sendo elas: *pmrA* – missense mutation no isolado 4110 (E167G) e mutação silenciosa no isolado 4110 (R64R); *pmrB* – mutação *missense* no isolado 966 (S163P) e isolado 3742 (V299F), mutações *missense* e silenciosa no isolado 4110 (A84A, G110R, P145P, L233L); *pmrD* – mutação silenciosa no isolado 4110 (L25L); e *phoQ* – mutação silenciosa no isolado 4110 (I148I, S301S, D416D). Embora algumas mutações associadas ao gene *pmrB* sejam frequentemente encontradas no Brasil (R256G e T246A) (Aires *et al.*, 2016), elas não foram encontradas em nossos isolados.

A capacidade de disseminação do isolado está intimamente ligada a Sequence Type (ST) do mesmo. A ST encontrada com maior incidência em nosso estudo foi a ST437, encontrada em 6 isolados (50%). ST11, assim como a ST340 fazem parte do CC258 (Peirano *et al.*, 2017), e foram encontradas, respectivamente, em quatro (33,3%) e um isolado (9,1%).

A ST16, recentemente relatada por Andrey e colaboradores (2019), foi encontrada em apenas um isolado, e assim como no relato de Andrey em que é descrito um clone de alto risco, o isolado presente em nosso estudo também parece ser. Levando em consideração que a mutação de genes alvos envolvido na resistência das cepas (*pmrA*, *pmrB*, *pmrD* e *phoQ*) confere adaptação e perpetuação das espécies, esse isolado se mostrou o mais mutado dentre todos os isolados do estudo, corroborando para a possibilidade de ser um isolado de alto risco.

Diversas STs já foram descritas em isolados com *mgrB* deletado, como ST512 e ST2261, sendo a maior parte delas associada à ST258. (Cannatelli *et al.* 2013; Giani *et al.*, 2015; Leung *et al.*, 2017; Bernasconi *et al.*, 2018). Em nosso trabalho, o isolado com *mgrB* deletado faz parte da ST11, fazendo parte do CC258 (Peirano *et al.*, 2017).

A disseminação clonal de isolados bacterianos resistentes a antibióticos é uma preocupação no ambiente hospitalar (Andrey *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2011). Analisando os resultados do nosso estudo, é possível considerar a disseminação de um clone no hospital 2, visto que os três isolados obtidos no hospital pertencem à mesma ST437 e apresentavam a mesma IS5. Além disso, a questão temporal pode reforçar a hipótese, pois dois dos três isolados foram obtidos no mesmo mês de 2013. Outra possibilidade de disseminação clonal pode ser considerada no Hospital 3, visto que dois isolados pertencem à mesma ST11, possuem o *mgrB* mutado pela mesma ISKpn13 e foram obtidos em um período de 3 meses.

Levando em consideração todos os dados encontrados no estudo, alguns achados corroboraram ao que já está descrito na literatura, contudo a inserção da sequência IS3 é inédita em isolados brasileiros. Ainda, mutação nos genes canônicos que também levam ao desenvolvimento de resistência de polimixina foram identificadas pela primeira vez, como mutações missense (E167G) no gene *pmrA*, mutações missense e no gene *pmrB* (S163P, V299F, G110R), dentre outras mutações que não levam a alteração em aminoácidos.

Sabendo que a resistência a polimixina é um sistema complexo, e tendo ainda diversos isolados que apresentam o gene *mgrB* intacto, mas com MIC superior a 32 µg/mL, um possível estudo futuro seria avaliar por NGS esses isolados para conseguir determinar outros determinantes de resistência.



## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





AbuOun, M.; Stubberfield, E.J.; Duggett, N.A.; Kirchner, M.; Dormer, L.; Nunez-Garcia, J.; Randall, L.P.; Lemma, F.; Crook, D.W.; Teale, C.; Smith, R.P.; Anjum, M.F. mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. **J Antimicrob Chemother.** 2018. 73(10):2904. doi: 10.1093/jac/dky272.

Adeolu, M.; Alnajar, S.; Naushad, S. S.; Gupta, R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov.. **Int J Syst Evol Microbiol.** 2016. 66(12):5575-5599. doi: 10.1099/ijsem.0.001485.

Aires, C. A.; Pereira, P. S.; Asensi, M. D.; Carvalho-Assef, A. P. mgrB Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** 2016. Oct 21;60(11):6969-6972. doi: 10.1128/AAC.01456-16.

Allen, H.K.; Donato, J.; Wang, H. H.; Cloud-Hansen K.A.; Davies, J.; Handelsman, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nat Rev Microbiol.** 2010. 8(4):251-9. doi: 10.1038/nrmicro2312.

Andrade, L.N.; Curiao, T.; Ferreira, J.C.; Longo, J.M.; Clímaco, E.C.; Martinez, R.; Bellissimo-Rodrigues, F.; Basile-Filho, A.; Evaristo, M.A.; Del Peloso, P.F.; Ribeiro, V.B.; Barth, A.L.; Paula, M.C.; Baquero, F.; Cantón, R.; Darini, A.L.; Coque, T.M. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** 2011. 55(7):3579-83. doi: 10.1128/AAC.01783-10.

Andrey, D.O.; Dantas, P.; Martins, W.B.S.; Marques de Carvalho, F.; Gonzaga, L.A.; Sands, K.; Portal, E.; Sauser, J.; Cayô, R.; Nicolas, M.F.; Vasconcelos, A.T.R.; Medeiros, E.A.; Walsh, T.R.; Gales, A.C. An Emerging Clone, KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST16, Associated with High Mortality Rates in a CC258 Endemic Setting. **Clin Infect Dis.** 2019. pii: ciz1095. doi: 10.1093/cid/ciz1095.

Bernasconi, O.J.; Donà, V.; Pires, J.; Kuenzli, E.; Hatz, C.; Luzzaro, F.; Perreten, V.; Endimiani, A. Deciphering the complete deletion of the mgrB locus in an unusual colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate colonising the gut of a traveller returning from India. **Int J Antimicrob Agents.** 2018. 51(3):529-531. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.014.

Biswas, S.; Brunel, J.M.; Dubus, J.C.; Reynaud-Gaubert, M.; Rolain, J.M. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. **Expert Rev Anti Infect Ther.** 2012. 10(8):917-34. doi: 10.1586/eri.12.78.

Breilh, D.; Texier-Maugein, J.; Allaouchiche, B.; Saux, M.C.; Boselli, E. Carbapenems. **J Chemother.** 2013. Feb;25(1):1-17. doi: 10.1179/1973947812Y.0000000032.

Boszczowski, I.; Salomão, M. C.; Moura, M. L.; Freire, M. P.; Guimarães, T.; Cury, A. P.; Rossi, F.; Rizek, C. F.; Martins, R. C. R.; Costa, S. F. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: genetic diversity, mechanisms of resistance to polymyxins and clinical outcomes in a tertiary teaching hospital in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2019. 61:e29. doi: 10.1590/S1678-9946201961029.

Campos, M. A.; Vargas, M. A.; Regueiro, V.; Llompарт, C. M.; Alberti, S.; Bengoechea, J. A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infect. Immun.** 2004. 72(12):7107-14.

Cannatelli, A.; D'Andrea, M.M.; Giani, T.; Di Pilato, V.; Arena, F.; Ambretti, S.; Gaibani, P.; Rossolini, G.M. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrob Agents Chemother.** 2013. 57(11):5521-6. doi: 10.1128/AAC.01480-13.

Cannatelli, A.; Giani, T.; D'Andrea, M. M.; Di Pilato, V.; Arena, F.; Conte, V.; Tryfinopoulou, K.; Vatopoulos, A.; Rossolini, G.M.; COLGRIT Study Group. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Antimicrob Agents Chemother.** 2014. 58(10):5696-703. doi: 10.1128/AAC.03110-14.

Capone, A.; Giannella, M.; Fortini, D.; Giordano, A.; Meledandri, M.; Ballardini, M.; Venditti, M.; Bordi, E.; Capozzi, D.; Balice, M. P.; Tarasi, A.; Parisi, G.; Lappa, A.; Carattoli, A.; Petrosillo, N. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. **Clin Microbiol Infect.** 2013. 19(1):E23-E30. doi: 10.1111/1469-0691.12070.

Carattoli, A.; Villa, L.; Feudi, C.; Curcio, L.; Orsini, S.; Luppi, A.; Pezzotti, G.; Magistrali, C. F. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Euro Surveill.** 2017. 3;22(31). pii: 30589. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589.

Doi, Y.; Wachino, J.I.; Arakawa, Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infect Dis Clin North Am.** 2016. 30(2):523-537. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.011.

Dong, N.; Yang, X.; Zhang, R.; Chan, E. W.; Chen, S. Tracking microevolution events among ST11 carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* outbreak strains. **Emerg Microbes Infect.** 2018. 7(1):146. doi: 10.1038/s41426-018-0146-6.

Ellem, J. A.; Ginn, A. N.; Chen, S. C.; Ferguson, J.; Partridge, S. R.; Iredell, J. R. Locally Acquired mcr-1 in *Escherichia coli*, Australia, 2011 and 2013. **Emerg Infect Dis**. 2017. 23(7):1160-1163. doi: 10.3201/eid2307.161638.

Esposito, E.P.; Cervoni, M.; Bernardo, M.; Crivaro, V.; Cuccurullo, S.; Imperi, F.; Zarrilli, R. Molecular Epidemiology and Virulence Profiles of Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Blood Isolates From the Hospital Agency "Ospedale dei Colli," Naples, Italy. **Front Microbiol**. 2018. 9:1463. doi: 10.3389/fmicb.2018.01463.

European Centre for Disease Prevention and Control. Point Prevalence Survey of Healthcare associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals. Stockholm: ECDC; 2013. Available from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/healthcare-associated-infectionsantimicrobial-use-PPS.pdf>. Accessed January 2020.

Evans, M.E.; Feola, D.J.; Rapp, R.P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. **Ann. Pharmacother**. 1999. 33(9):960-7.

Ezadi, F.; Ardebili, A.; Mirnejad, R. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations. **J Clin Microbiol**. 2019. 57(4). pii: e01390-18. doi: 10.1128/JCM.01390-18.

França, L.T.; Carrilho, E.; Kist, T.B. A review of DNA sequencing techniques. **Q Rev Biophys**. 2002. 35(2):169-200.

Gao, R.; Hu, Y.; Li, Z.; Sun, J.; Wang, Q.; Lin, J.; Ye, H.; Liu, F.; Srinivas, S.; Li, D.; Zhu, B.; Liu, Y. H.; Tian, G. B.; Feng, Y. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. **PLoS Pathog**. 2016. 2(11):e1005957. doi: 10.1371/journal.ppat.1005957.

Giani, T.; Arena, F.; Vaggelli, G.; Conte, V.; Chiarelli, A.; Henrici De Angelis, L.; Fornaini, R.; Grazzini, M.; Niccolini, F.; Pecile, P.; Rossolini, G. M. Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Traced to Clonal Expansion of an mgrB Deletion Mutant. **J Clin Microbiol**. 2015. 53(10):3341-4. doi: 10.1128/JCM.01017-15.

Haeili, M.; Javani, A.; Moradi, J.; Jafari, Z.; Feizabadi, M.M.; Babaei, E. MgrB Alterations Mediate Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Iran. **Front Microbiol**. 2017. 8:2470. doi: 10.3389/fmicb.2017.02470.

Halaby, T.; Kucukkose, E.; Janssen, A.B.; Rogers, M.R.; Doorduyn, D.J.; van der Zanden, A.G.; Al Naiemi, N.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.; van Schaik, W. Nov. Genomic Characterization of Colistin Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a Nosocomial Outbreak. **Antimicrob Agents Chemother**. 2016. 60(11):6837-6843. doi: 10.1128/AAC.01344-16.

Hasman, H.; Hammerum, A. M.; Hansen, F.; Hendriksen, R. S.; Olesen, B.; Agersø, Y.; Zankari, E.; Leekitcharoenphon, P.; Stegger, M.; Kaas, R. S.;

Cavaco, L. M.; Hansen, D. S.; Aarestrup, F. M.; Skov, R. L. Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark. **Eurosurveillance**. 2015. 20(49). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085.

Helander I.M.; Kato, Y.; Kilpelainen, I.; Kostianen, R.; Lindner, B.; Nummila, K.; Sugiyama, T.; Yokochi, T. Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. **Eur. J. Biochem**. 1996. 237(1):272-8.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 20776-1:2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1 - Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobials agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland, 2006.

Irrgang, A.; Roschanski, N.; Tenhagen, B.A.; Grobbel, M.; Skladnikiewicz-Ziemer, T.; Thomas, K.; Roesler, U.; Käsebohrer, A. Prevalence of mcr-1 in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010–2015. **PlosOne**. 2016. 11(7):e0159863. doi: 10.1371/journal.pone.0159863.

Karaiskos, I.; Lagou, S.; Pontikis, K.; Rapti, V.; Poulakou, G. The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. **Front Public Health**. 2019. 7:151. doi: 10.3389/fpubh.2019.00151.

Larsen, M. V.; Cosentino, S.; Rasmussen, S.; Friis, C.; Hasman, H.; Marvig, R. L.; Jelsbak, L.; Sicheritz-Pontén, T.; Ussery, D. W.; Aarestrup, F. M.; Lund, O. Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. **J. Clin. Microbiol**. 2012. 50(4): 1355-1361. doi: 10.1128/JCM.06094-11

Leung, L.M.; Cooper, V.S.; Rasko, D.A.; Guo, Q.; Pacey, M.P.; McElheny, C.L.; Mettus, R.T.; Yoon, S.H.; Goodlett, D.R.; Ernst, R.K.; Doi, Y. Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**. 2017. 72(11):3035-3042. doi: 10.1093/jac/dkx234.

Li, X.P.; Sun, R.Y.; Song, J.Q.; Fang, L.X.; Zhang, R.M.; Lian, X.L.; Liao, X.P.; Liu, Y.H.; Lin, J.; Sun, J. Within-host heterogeneity and flexibility of mcr-1 transmission in chicken gut. **Int J Antimicrob Agents**. 2020. 55(1):105806. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.09.010.

Lippa, A.M.; Goulian, M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. **PLoS Genet**. 2009. 5(12):e1000788. doi: 10.1371/journal.pgen.1000788.

Liu, Y. Y.; Wang, Y.; Walsh, T. R.; Yi, L. X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; Yu, L. F.; Gu, D.; Ren, H.; Chen, X.; Lv, L.; He, D.; Zhou, H.; Liang, Z.; Liu, J. H.; Shen, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a

microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**. 2015. 16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

Liu, Y. Y.; Chandler, C. E.; Leung, L. M.; McElheny, C. L.; Mettus, R. T., Shanks, R. M. Q.; Liu, J. H.; Goodlett, D. R.; Ernst, R. K.; Doi, Y. Structural Modification of Lipopolysaccharide Conferred by *mcr-1* in Gram-Negative ESKAPE Pathogens. **Antimicrob Agents Chemother**. 2017. 61(6). pii: e00580-17. doi: 10.1128/AAC.00580-17.

Lomonaco, S.; Crawford, M.A.; Lascols, C.; Timme, R.E.; Anderson, K.; Hodge, D.R.; Fisher, D.J.; Pillai, S.P.; Morse, S.A.; Khan, E.; Hughes, M.A.; Allard, M.W.; Sharma, S.K. Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **PLoS One**. 2018. 13(6):e0198526. doi: 10.1371/journal.pone.0198526.

Macesic, N.; Nelson, B.; Mcconville, T. H.; Giddins, M. J.; Green, D. A.; Stump, S.; Gomez-Simmonds, A.; Annavajhala, M. K.; Uhlemann, A. C. Emergence of Polymyxin Resistance in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Through Diverse Genetic Adaptations: A Genomic, Retrospective Cohort Study. **Clin Infect Dis**. 2020. 70(10):2084-2091. doi: 10.1093/cid/ciz623.

Maiden, M.C.; Bygraves, J.A.; Feil, E.; Morelli, G.; Russell, J.E.; Urwin, R.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Zurth, K.; Caugant, D.A.; Feavers, I.M.; Achtman, M.; Spratt, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 1998. 95(6):3140-5.

Munoz-Price, L. S.; Poirel, L. Bonomo, R. A.; Schwaber, M. J., Daikos, G. L.; Cormican, M.; Cornaglia, G.; Garau, J.; Gniadkowski, M.; Hayden, M. K.; Kumarasamy, K.; Livermore, D. M.; Maya, J. J.; Nordmann, P.; Patel, J. B. ; Paterson, D. L.; Pitout, J.; Villegas, M. V.; Wang, H.; Woodford, N.; Quinn, J. P. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis**. 2013. 13(9):785-96. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70190-7.

Olaitan, A.O.; Morand, S.; Rolain, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol**. 2014. 5:643. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643.

Padilla, E.; Llobet, E.; Domenech-Sanchez, A.; Martinez-Martinez, L.; Bengoechea, J. A.; Alberti, S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrob. Agents Chemother**. 2010. 54(1):177-83. doi: 10.1128/AAC.00715-09.

Pareek, C. S.; Smoczynski, R.; Tretyn, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **J Appl Genet**. 2011. 52(4):413-35. doi: 10.1007/s13353-011-0057-x.

Partridge, S. R. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. **Pathology**. 2015. 47(3):276-84. doi: 10.1097/PAT.0000000000000237.

Peri, A. M.; Doi, Y.; Potoski, B. A.; Harris, P. N. A.; Paterson, D. L.; Righi, E. Antimicrobial treatment challenges in the era of carbapenem resistance. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2019. 94(4):413-425. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.020.

Pitt, M.E.; Elliott, A.G.; Cao, M.D.; Ganesamoorthy, D.; Karaikos, I.; Giamarellou, H.; Abboud, C.S.; Blaskovich, M.A.T.; Cooper, M.A.; Coin, L.J.M. Multifactorial chromosomal variants regulate polymyxin resistance in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Microb Genom.** 2018. 4(3). doi: 10.1099/mgen.0.000158.

Prim, N.; Rivera, A.; Rodríguez-Navarro, J.; Español, M.; Turbau, M.; Coll, P.; Mirelis, B. Detection of *mcr-1* colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. **Eurosurveillance.** 2016. 21(13). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.13.30183.

Raetz, C. R.; Reynolds, C. M.; Trent, M. S.; Bishop, R. E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Biochem.** 2007. 76:295-329.

Ramirez, M.S.; Tolmasky, M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resist Updat.** 2010. 13(6):151-71. doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003.

Robicsek, A.; Jacoby, G.A.; Hooper, D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet Infect Dis.** 2006. 6(10):629-40.

Rodrigues, A. C. S.; Santos, I. C. O.; Campos, C. C.; Rezende, I. N.; Ferreira, Y. M.; Chaves, C. E. V.; Rocha-de-Souza, C. M.; Carvalho-Assef, A. P. D.; Chang, M. R. Non-clonal occurrence of *pmrB* mutations associated with polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2019. 114:e180555. doi: 10.1590/0074-02760180555.

Serio, A.W.; Keepers, T.; Andrews, L.; Krause, K.M. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. **EcoSal Plus.** 2018. 8(1). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018.

Schleinitz, K.M.; Vallaey, T.; Kleinstein, S. Structural characterization of ISCR8, ISCR22, and ISCR23, subgroups of IS91-like insertion elements. **Antimicrob Agents Chemother.** 2010. 54(10):4321-8. doi: 10.1128/AAC.00006-10.

Shankar, C.; Mathur, P.; Venkatesan, M.; Pragasa, A. K.; Anandan, S.; Khurana, S.; Veeraraghavan, B. Rapidly disseminating blaOXA-232 carrying *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST231 in India: multiple and varied mobile genetic elements. **BMC Microbiol.** 2019. 19(1):137. doi: 10.1186/s12866-019-1513-8.

Urwin, R.; Maiden, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends Microbiol.** 2003. 11(10):479-87.

Uz Zaman, T.; Abladi, M.; Siddique, M. I.; Aljohani, S. M.; Balkhy, H. H. Insertion element mediated *mgrB* disruption and presence of ISKpn28 in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Saudi Arabia. **Infect Drug Resist.** 2018. 11:1183-1187. doi: 10.2147/IDR.S161146.

Yang, Y.Q.; Li, Y.X.; Lei, C.W.; Zhang, A.Y.; Wang, H.N. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.** 2018. 73(7):1791-1795. doi: 10.1093/jac/dky111.

Ye, H.; Li, Y.; Li, Z.; Gao, R.; Zhang, H.; Wen, R.; Gao, G. F.; Hu, Q.; Feng, Y. Diversified *mcr-1*-harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. **MBio.** 2016. 7(2):e00177. doi: 10.1128/mBio.00177-16.

Yin, W.; Li, H.; Shen, Y.; Liu, Z.; Wang, S.; Shen, Z.; Zhang, R.; Walsh, T.R.; Shen, J.; Wang, Y. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. **MBio.** 2017. 8(3). pii: e00543-17. doi: 10.1128/mBio.00543-17.

Wang, X.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Li, J.; Yin, W.; Wang, S.; Zhang, S.; Shen, J.; Shen, Z.; Wang, Y. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerg Microbes Infect.** 2018. 7(1):122. doi: 10.1038/s41426-018-0124-z.

Xavier, B. B.; Lammens, C.; Ruhal, R.; Kumar-Singh, S.; Butaye, P.; Goossens, H.; Malhotra-Kumar, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Eurosurveillance.** 2016. 21(27). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280.

Xiaoliang, W.; Huiming, H.; Chunlei, C.; Beiwen, Z. Genomic characterisation of a colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 strain co-producing KPC-2, FloR, CTX-M-55, SHV-12, FosA and RmtB causing a lethal infection. **J Glob Antimicrob Resist.** 2019. 19:78-80. doi: 10.1016/j.jgar.2019.08.023.

Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F. M.; Larsen, M. V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother.** 2012. doi: 10.1093/jac/dks261.

Zavascki, A.P.; Girardello, R.; Magagnin, C.M.; Antochévis, L.C.; Maciel, R.A.; Palmeiro, J.K.; Gales, A.C.; Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2018. 90(2):134-138. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.006.

Zhang, H.; Zhao, D.; Shi, Q.; Quan, J.; Li, X.; Yu, Y. The *mcr-1* Gene Has No Effect on Colistin Resistance When It Coexists with Inactivated *mgrB* Gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Microb Drug Resist.** 2018. 24(8):1117-1120. doi: 10.1089/mdr.2017.0291.